

THESIS

MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

DIE HEMMWIRKUNG DES
KLAREN HÜHNEREI-EIWEISSES UND DES AVIDINS
AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE IN VIVO

Paulus Behnam / Siauisch

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

DIE HEMMWIRKUNG DES
KLAREN HÜHNEREI-EIWEISSES UND DES AVIDINS
AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Paulus Behnam Siauisch
aus Ankawa-Arbil/Irak

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan: Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 4. 1966

MEINEN LIEBEN ELTERN UND GESCHWISTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	7
Der Mechanismus der Fettsäuresynthese	7
Zur Regulation der Fettsäuresynthese	13
Zum Wirkungsmechanismus des enzymgebundenen Biotins	14
Über Avidin und seine Hemmwirkung auf biotinhaltige Enzyme	17
2. Problemstellung und Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen	19
3. Durchführung der Versuche	20
4. Ergebnisse	23
Atmungsversuche	23
Lipogenese	31
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung	42
7. Literaturverzeichnis	43
8. Lebenslauf	50

Digitized by the Internet Archive
in 2026

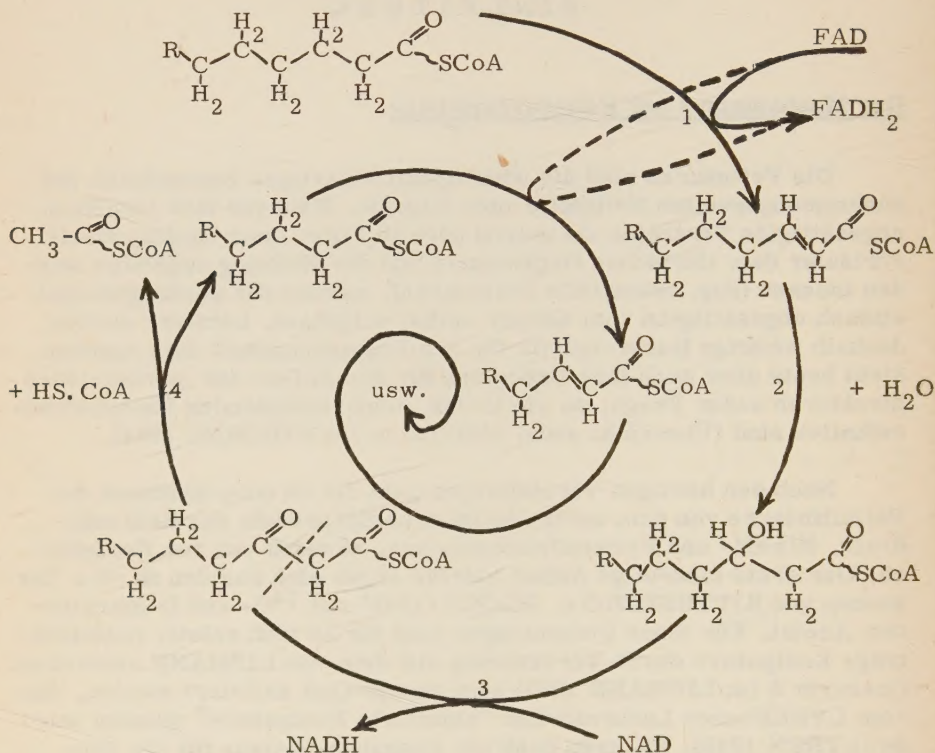
EINLEITUNG

Der Mechanismus der Fettsäuresynthese

Die Fettsäuren sind die wichtigsten fettartigen Bestandteile der zusammengesetzten Fettstoffe oder Lipide. Während ihre mehrfach ungesättigten Vertreter als solche oder in Form ihrer Stoffwechselvorläufer dem tierischen Organismus mit der Nahrung zugeführt werden müssen (sog. essentielle Fettsäuren), werden die gesättigten und einfach ungesättigten vom Körper selbst aufgebaut. Letztere stellen deshalb wichtige Reservestoffe für den Energiehaushalt dar; daneben steht heute aber auch ihre Bedeutung für den Aufbau der subzellulären Strukturen außer Frage, da sie in den membranbildenden Phosphatiden enthalten sind (Übersicht siehe ANSELL u. HAWTHORNE 1964).

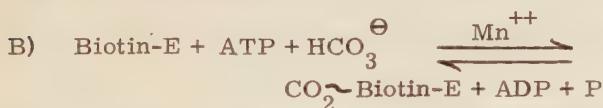
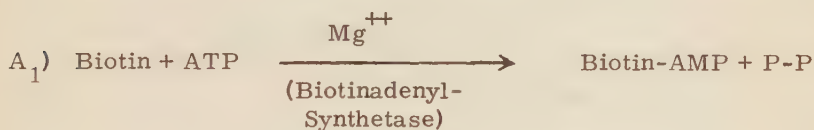
Nach den heutigen Vorstellungen geht die de novo-Synthese der Palmitinsäure von dem zentralen Intermediärprodukt des Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsels aus, nämlich von der Essigsäure. Der erste eindeutige Anhalt hierfür ergab sich aus den in vivo-Ver-
suchen von RITTENBERG u. BLOCH (1945) mit ^{14}C - und D-markiertem Acetat. Für diese Umsetzungen muß die an sich relativ reaktions-
träge Essigsäure durch Veresterung mit dem von LIPMANN entdeckten Coenzym A (s. LIPMANN 1953) zum Acetyl-CoA aktiviert werden, das vom LYNENschen Laboratorium "aktivierte Essigsäure" genannt wurde (LYNEN 1942). Sie kann dann als Ausgangssubstanz für die Biosynthese der langkettigen Fettsäuren dienen (KAPLAN u. LIPMANN 1946). Zahlreiche Versuchsergebnisse deuteten daraufhin, daß der dabei ablaufende, in den Mitochondrien lokalisierte Synthesemechanismus eine Umkehrung der von LYNEN konzipierten Abbaupirale der Fettsäuren darstellt (LYNEN 1953), daß diese also je nach der Stoffwechsellaage als oxydativer (im Sinne des Abbaus) oder als reduktiver (im Sinne des Aufbaus) Prozeß durchlaufen werden kann (SEUBERT u. Mitarb. 1957).

Die Abbauspirale der Fettsäuren nach LYNEN:
(entnommen aus RAPOPORT 1962)



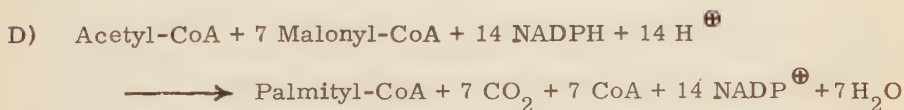
Mit dieser Annahme ließen sich jedoch die Befunde der Arbeitsgruppe aus dem GREENschen Laboratorium nicht vereinbaren, die mit einem im freien Cytoplasma enthaltenen, sehr aktiven Enzymsystem der Taubenleber arbeiteten (GIBSON u. Mitarb. 1957). Dieses System war nur funktionsfähig in Gegenwart von Bicarbonat-Ionen, obwohl der Carbonat-Kohlenstoff nicht in das Reaktionsprodukt Palmitinsäure eingebaut wurde (GIBSON u. Mitarb. 1958 a, b). Außerdem fehlten ihm einige Fermente des LYNEN-Zyklus (GIBSON u. Mitarb. 1958 b). Und schließlich hing seine Aktivität direkt von dem Biotingehalt der Präparation ab (WAKIL u. Mitarb. 1958; WAKIL u. GIBSON 1960). Durch Inaktivierung des Biotins durch dessen Bindung an Avidin wurde dementsprechend auch die Bildung der Fettsäuren aus Acetyl-CoA weitgehend unterdrückt.

WAKIL (1958) konnte zeigen, daß das Bicarbonat zur Umsetzung des Acetyl-CoA zum Malonyl-CoA dient und daß das Malonyl-CoA ein tatsächliches Intermediärprodukt der Fettsäuresynthese ist. Zum gleichen Ergebnis kamen BRADY (1958) und LYNEN (1959). Diese Carboxylierungsreaktion wird durch die biotinhaltige Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert. Aus den Untersuchungen von LYNEN u. Mitarb. (1959) mit einem ähnlichen biotinhaltigen Enzym, der β -Methyl-Crotonyl-CoA-Carboxylase, ergab sich der Anhalt für das Auftreten eines Biotin- CO_2 -Komplexes, in dem 1 Mol CO_2 pro Enzymmolekül als "aktiviertes CO_2 "² gebunden ist. Einzelschritte zur Bildung dieses Komplexes und weiter zur Carboxylierung des Acetats zum Malonat sind (LYNEN u. ROMINGER 1963, KAZIRO u. Mitarb. 1962; VALLOTTON u. LEUTHARDT 1964):

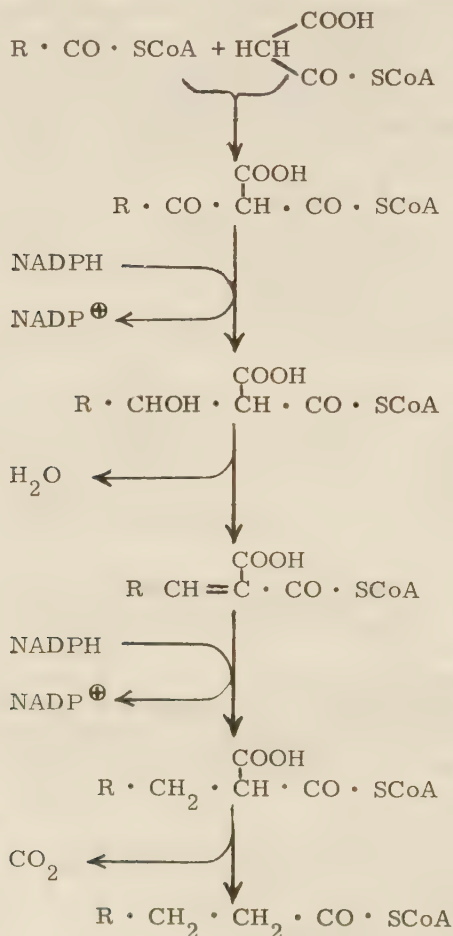


Bei E handelt es sich um das Apoferment der Acetyl-CoA-Carboxylase, das aus verschiedenen Geweben isoliert worden ist (s. GIBSON 1963).

Das derart gebildete Malonyl-CoA ist nun der eigentliche Grundbaustein für die Biosynthese der langkettigen Fettsäuren. Acetyl-CoA wird entsprechend der Summengleichung D dieser "Synthetase"-Reaktion lediglich einmal als "Starter" in jeder Fettsäurekette benötigt (WAKIL 1961):

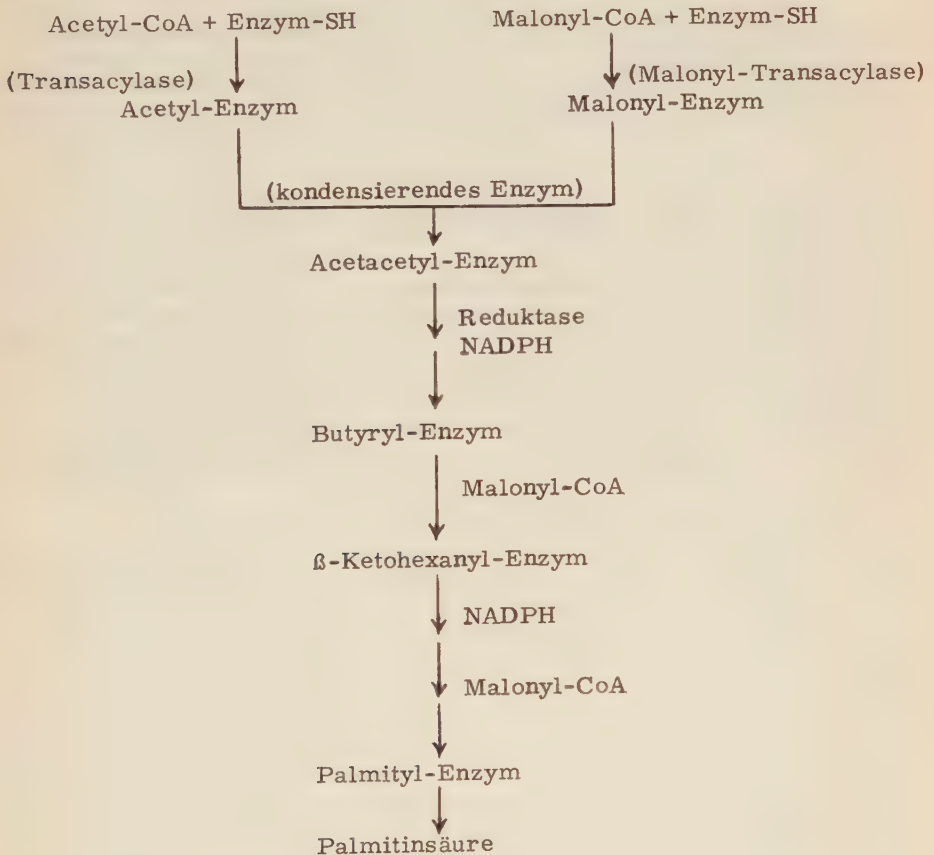


Der entscheidende Vorteil dieses Weges gegenüber der einfachen Umkehrung des Fettsäure-Abbaus ist energetischer Art (SCHWEIZER u. Mitarb. 1965). Im einzelnen gibt WAKIL (1960) folgende Reaktionsschritte für eine C_2 -Verlängerung an, deren Intermediärprodukte allerdings nicht isoliert werden konnten:



Es steht heute fest, daß-ähnlich wie von LYNEN (LYNEN u. Mitarb. 1960; LYNEN 1961) für den Multienzymkomplex aus Bäckerhefe gezeigt- die Zwischenprodukte nicht in freier Form auftreten, sondern enzymgebunden bleiben (BRESSLER u. WAKIL 1962; WAKIL u. BRESSLER 1962; GOLDMAN u. Mitarb. 1963; ROBINSON u. Mitarb. 1963; GOLDMAN 1964; MAJERUS u. Mitarb. 1964).

Am Anfang steht als Reaktionseinleitung die Umesterung von Acetyl- und Malonyl-CoA mit den SH-Gruppen des Synthetase-Enzyms als Thioester, an das die Folgeprodukte gebunden bleiben (BRODIE u. Mitarb. 1964):



Die LYNENsche Arbeitsgruppe hat die Fettsäure-Synthetase aus Bäckerhefe über 100-fach angereichert (SCHWEIZER u. Mitarb. 1965). Sie bestätigte, daß sämtliche Zwischenprodukte der Synthese, wie β-Keto-, β-Hydroxy- und α, β-ungesättigte Säuren während der Reaktion kovalent an das Enzym gebunden bleiben. Dabei tritt eine ständige Übertragung der Bildungsprodukte innerhalb des Enzyms von einer "zentralen" auf eine "periphere" Acceptorgruppe in der Weise ein, daß an die zentrale Gruppe der Malonyl-Rest angelagert und daraus dann die β-Keto-Verbindung gebildet wird. Damit anschließend ein neuer

Malonyl-Rest aufgenommen werden kann, wird der Säurerest auf die periphere Acceptorgruppe transportiert und damit die zentrale wieder frei.

Neben diesem cytoplasmatischen Enzymsystem, das die de novo-Synthese der Fettsäuren durchführt, existiert ein weiteres in den Mitochondrien (WAKIL u. Mitarb. 1960; HARLAN u. WAKIL 1962) bzw. Sarkosomen (HÜLSMANN 1960, 1962). Dieses ist nur zur Verlängerung bereits vorhandener Acyl-CoA-Verbindungen um 2 Kohlenstoffatome befähigt. Es besitzt allerdings nur etwa 1/10 der Aktivität des cytoplasmatischen (WAKIL 1961) und kann für die Netto-Synthese der gesättigten Fettsäuren als bedeutungslos angesehen werden. Seine Bedeutung liegt wahrscheinlich darin, daß es -z.B. ausgehend vom Syntheseprodukt des cytoplasmatischen Systems, der Palmitinsäure- zu den Fettsäuren mit 18 und mehr Kohlenstoffatomen führt, die wiederum anscheinend unerläßlich für die Bildung der polaren Lipide sind. Da die Mitochondrienmembran für Acyl-CoA-Verbindungen undurchlässig ist (SPENCER u. Mitarb. 1962; NORUM 1963), müssen die aktivierten Acylgruppen an Carnitin gekoppelt werden, um in das Innere der Mitochondrien gelangen und dort verlängert werden zu können (BREMER 1962; NORUM u. BREMER 1963; FRITZ u. YUE 1963; BRESSLER u. FRIEDBERG 1964; BRESSLER u. KATZ 1964).

Zur Regulation der Fettsäuresynthese

Die Höhe der Syntheserate für die gesättigten langkettigen Fettsäuren durch das cytoplasmatische Enzymsystem steht erklärlicherweise in enger Beziehung zum Glucosestoffwechsel, indem letzterer sowohl das Substrat als auch das erforderliche Reduktionspotential bereitstellt. Dementsprechend findet man eine Abhängigkeit der Fettsäuresynthese vom verfügbaren Kohlenhydratgehalt des Gewebes und von dessen Fähigkeit zur Umsetzung der Kohlenhydrate (Übersicht s. MASORO 1962).

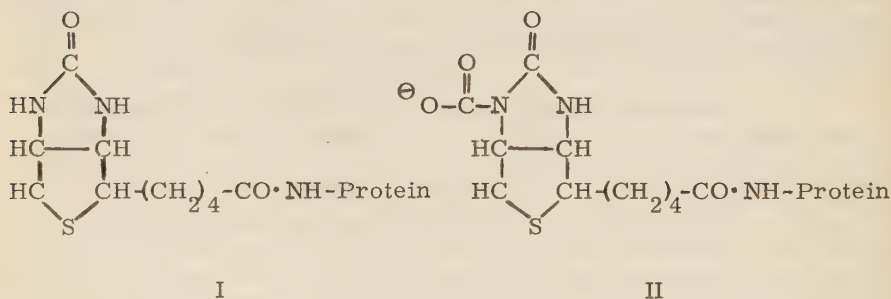
Der Zusammenhang zwischen Glykolyse und der Neubildung von Fettsäuren ist u.a. von VON BRAND u. HELMREICH (1956) untersucht worden. Es ergab sich eine Abhängigkeit von der Bereitstellung an NADH und NADPH (SEITZ u. VON BRAND 1959). Es ist auch bekannt, daß die Fettsäuresynthese im hungernden Organismus herabgesetzt ist (z.B. VON BRAND 1959). NUMA u. Mitarb. (1961) machten dafür auf Grund ihrer Versuchsergebnisse die Aktivitätsabnahme der Acetyl-CoA-Carboxylase verantwortlich, und es scheint (GANGULY 1960), daß der durch dieses Enzym katalysierte Schritt limitierend für die Gesamtsynthese der langkettigen Fettsäuren ist (s. MASORO 1962).

Es gibt inzwischen eine Reihe von Versuchsserien, in denen die Beeinflussbarkeit der Acetyl-CoA-Carboxylase untersucht wurde. Vor allem Citrat (CONIGLIO u. POPJAK 1962; MARTIN u. VAGELOS 1962 a, b; VAGELOS u. Mitarb. 1963; WHITE u. KLEIN 1965) und Isocitrat (WAITE u. WAKIL 1963 a) zeigten einen ausgeprägten stimulierenden Effekt auf dieses Enzym (s. auch WAKIL 1965), der durch Zugabe von Mitochondrien ersetzt werden konnte (ILIFFE u. MYANT 1964; BHADURI u. SRERE 1964). Citrat wirkt aber in gleichem Sinne auch noch auf andere an der Fettsäuresynthese beteiligten Reaktionen (BRADY u. Mitarb. 1956; SRERE u. BHADHURI 1962). Für das Enzymsystem aus der Rattenmilchdrüse konnte eine Abhängigkeit der Kettenlänge der synthetisierten Fettsäuren von der Citratkonzentration im System nachgewiesen werden (SMITH u. DILS 1964). Mittelkettige Fettsäuren besaßen eine starke Hemmwirkung auf die Acetyl-CoA-Carboxylase dieser Drüse (LEVY 1963).

Zum Wirkungsmechanismus des enzymgebundenen Biotins

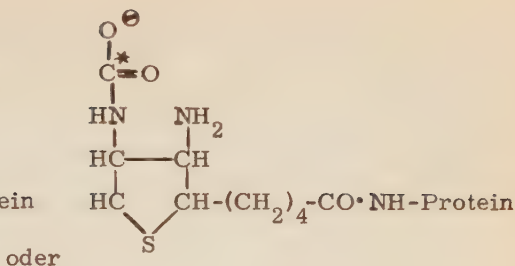
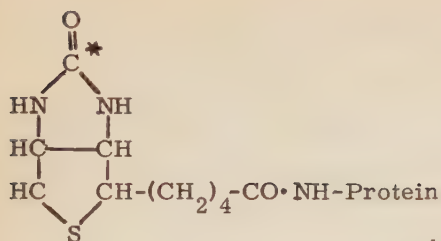
Wie bereits erwähnt, ist die Acetyl-CoA-Carboxylase ein konjugiertes Protein mit Biotin als prosthetischer Gruppe (WAKIL u. Mitarb. 1958; WAKIL u. GIBSON 1960). Auch in anderen carboxylierenden und transcarboxylierenden Enzymen konnte Biotin als Wirkgruppe identifiziert werden, so in der β , β -Dimethylacrylyl-CoA-Carboxylase durch LYNEN u. Mitarb. (1960), in der Propionyl-CoA-Carboxylase durch HALENZ u. LANE (1960), LANE u. Mitarbeiter (1960), sowie KAZIRO u. Mitarb. (1960), in der Butyryl-CoA-Carboxylase durch STERN u. Mitarbeiter (1959), in der Pyruvat-Carboxylase durch UTTER u. KEECH (1960) und in der Transcarboxylase, die Methylmalonyl-CoA und Brenztraubensäure in Propionyl-CoA und Oxalessigsäure umwandelt, durch SWICK u. WOOD (1960).

Nach LYNEN u. Mitarb. (KNAPPE u. Mitarb. 1961 a, b; LYNEN u. Mitarb. 1961), die das carboxylierte Biotin isoliert haben, wird das Biotin-Enzym (I) in das 1'-N-Carboxybiotin-Enzym (II) übergeführt:

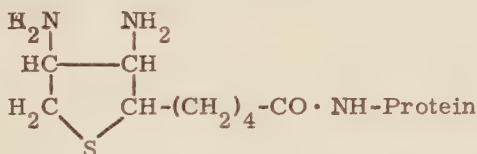


Hierbei wird von der Voraussetzung ausgegangen, daß dem eigentlichen, also decarboxylierten Biotin die von KÖGL u. Mitarb. sowie von DU VIGNEAUD u. Mitarb. ermittelte Struktur I zukommt.

Demgegenüber vertreten WAITE u. WAKIL (1963 b) die Auffassung, daß der Ureidokohlenstoff des an das Apoferment der Carboxylase gebundenen Biotins bereits der zu übertragende Carbonatkohlenstoff ist:

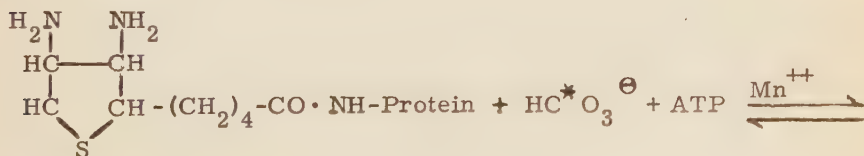


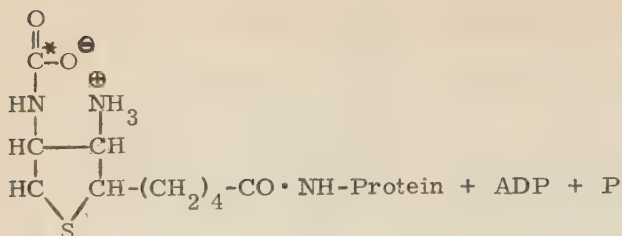
Dabei könnte die freie Aminogruppe der Struktur IV evtl. durch das Protein des Apofermentes stabilisiert werden. Die Untersuchungen von SCHAEFFER u. BHARGAVA (1964) mit verschiedenen analogen Modellverbindungen unterstützen die Annahme von WAITE u. WAKIL, wonach dem Biotin die Struktur V zukommt:



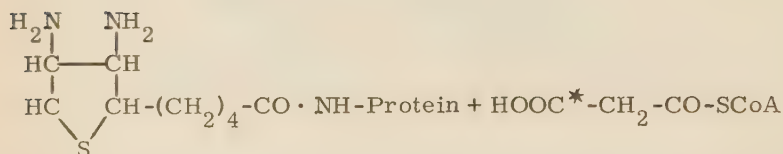
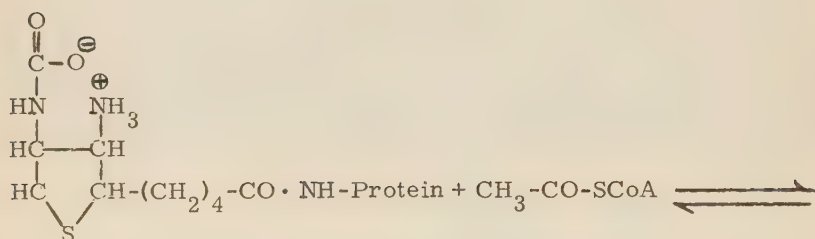
Es ergab sich dabei, daß die CO_2 -Gruppe unter extrem milden Bedingungen übertragbar ist und daß die Struktur IV keinerlei Stabilisierung von außen bedarf. Die ursprünglich aufgestellte Struktur I stellt demnach ein im Verlauf der Reindarstellung des Vitamins erzeugtes Kunstprodukt dar, indem es zur entsprechenden intramolekularen Umlagerung des carboxylierten Biotins kam. Der Mechanismus der CO_2 -Übertragung sieht nach WAITE und WAKIL folgendermaßen aus:

B)





C)



Gegen die aktive Beteiligung des Ureidokohlenstoffs an den Trans-carboxylierungsreaktionen sprechen allerdings die Versuchsergebnisse anderer Autoren (MELVILLE u. Mitarb. 1949; ALLEN u. Mitarb. 1963), sodaß hier das letzte Wort wohl noch nicht gesprochen ist.

Über Avidin und seine Hemmwirkung für biotinhaltige Enzyme

Ein einfacher Test zum Nachweis biotinhaltiger Enzyme ist deren Vorbehandlung mit Avidin, einem basischen Glykoprotein, das außer im rohen Vogeleiweiß (HERTZ u. SEBRELL 1942; JONES u. BRIGGS 1962) nur noch in der Gallerthülle von Froscheiern (HERTZ u. SEBRELL 1942) und im Albumin bildenden Gewebe des Oviduktes legender Hennen (FRAPS u. Mitarb. 1943) vorkommt. Es entsteht dabei ein stabiler Komplex (PENNINGTON u. Mitarb. 1942) mit einem Avidin/Biotin-Verhältnis von 1:3 (MELAMED u. GREEN 1963) unter völliger Einbuße der Biotinfunktion (s. MICKELSEN 1956). Diese Inaktivierung auch des proteingebundenen Biotins ist von WAKIL u. Mitarb. (1958) und von LYNEN u. Mitarb. (1959) zur Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase benutzt worden. Daß diese Hemmung durch Avidin nicht auf einem unspezifischen Effekt, sondern durch direkte Bindung des Carboxylase-Biotins beruht, legten die Versuche von WAKIL u. GIBSON (1960) nahe, bei denen eine vorherige Behandlung des Avidins mit freiem Biotin dessen Hemmwirkung aufhob. Die Avidinhemmung der Fettsäuresynthese läßt sich durch Biotin-Zusatz wieder beseitigen (WAKIL u. GIBSON 1960; VILLINGER 1962).

Avidin, dessen toxische Wirkung im Hühnereieiweiß durch die Arbeit von BOAZ (1924) bekannt und das zuerst von EAKIN u. Mitarb. (1940, 1941), später auch von FRAENKEL-CONRAT u. Mitarb. (1952) sowie von MELAMED u. GREEN (1963) aus diesem Material isoliert wurde, hat ein Molekulargewicht um 60 000, einen Kohlenhydratgehalt von etwa 10 % und einen ungewöhnlich hohen Tryptophangehalt von 6 % (FRAENKEL-CONRAT u. Mitarb. 1952). MELAMED u. GREEN (1963) konnten zwei oder drei verschiedene biotinbindende Aktivitäten darstellen. Der isoelektrische Punkt liegt bei 10,5; es handelt sich also um ein stark basisches Protein. Seine Zusammensetzung ist inzwischen im großen und ganzen bekannt (MELAMED u. GREEN 1963). Es läßt sich in 6 molarer Guanidinhydrochloridlösung unter Verlust des Biotinbindungsvermögens in drei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 17 700, mit wahrscheinlich unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung und je einem Alanin-Molekül in der Primärstruktur zerlegen (GREEN 1963 b; MELAMED u. GREEN 1963).

An dem Mechanismus der Biotin-Bindung ist Tryptophan direkt beteiligt (GREEN 1962, 1963 a). Von Seiten des Biotins ist zur Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes der erhaltene Ureido-Ring wichtig (s. GYÖRGY 1954), während dem Thiophan-Ring hierfür keine Bedeutung zukommt (DU VIGNEAUD u. Mitarb. 1942; SEBRELL u. HARRIS 1954).

Kürzlich konnten TAUSIG u. WOLF (1964) aus *Streptomyces*-Kulturen ein weiteres Protein mit biotinbindender Aktivität gewinnen, das Streptavidin, das sich gegenüber Biotin wie Avidin verhält, sich vom letzteren aber dadurch unterscheidet, daß es mit dl-Desthiobiotin keinen Komplex bildet (LICHSTEIN u. BIRNBAUM 1965).

PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN UNTERSUCHUNGEN

Die biologische Bedeutung des Biotins für transcarboxylierende Reaktionen steht heute außer Frage. Über seine Beteiligung an der Fettsäuresynthese als funktionelle Gruppe der Acetyl-CoA-Carboxylase gibt es, wie in den vorstehenden Abschnitten dargestellt, durch in vitro-Versuche eine Vielzahl von Beweisen. Aber auch bei in vivo-Versuchen konnte in biotinfrei ernährten Tieren eine Verringerung dieses Fermentes und damit der Fettsynthese an sich in den Lebern festgestellt werden (WAKIL u. Mitarb. 1959).

Es ergibt sich nun aus der Eigenschaft des Avidins, Biotin und biotinhaltige Fermente durch Bildung eines stabilen Komplexes zu inaktivieren, die Frage, ob -wenigstens bei Vögeln- diese Substanz eine biologische Bedeutung als Regulator der Fettsäuresynthese besitzt, zumal die Avidinproduktion im Hühnereileiter hormoneller Beeinflussung unterliegt (HERTZ u. Mitarb. 1943, 1944; HERTZ 1946). Allerdings konnte Avidin bisher außer in diesem Organ und im Eiereiweiß in keinem anderen Gewebe nachgewiesen werden, was jedoch seine völlige Abwesenheit z.B. in der Leber nicht von vornherein ausschließt.

Es sollte deshalb versucht werden, durch parenterale Zufuhr von Avidin bzw. Hühnereiereiweiß an Tauben eine Biotinverarmung des Organismus und damit eine Reduktion der Fettsäuresynthese in der Leber zu erreichen. Dabei wurde bewußt in Kauf genommen, daß erstens die Resorptionsquote des Avidins am Injektionsort ungewiß ist -die Präparate wurden intramuskulär verabreicht-, da zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung dieser Arbeit kein einfacher Test zur Ermittlung des Avidingehaltes in Geweben und Körperflüssigkeiten bekannt war. Erst vor kurzem ist von GREEN (1963 c, 1965) eine derartige Bestimmungsmethode angegeben worden. Zweitens bleibt selbst bei weitgehendem Übergang des Avidins in den Blutkreislauf die Frage offen, ob dieser Eiweißstoff trotz seines relativ niedrigen Molekulargewichtes überhaupt in das Zellinnere des untersuchten Erfolgsorgans gelangt. Und drittens besteht schließlich die Möglichkeit, daß alle erzielten Effekte unspezifischer Natur sind.

DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

Für die vorliegenden Versuche wurden 5-8 Monate alte Tauben verwendet, die 8-14 Tage lang mit Wasser und Weizenkörnern ad libitum ernährt wurden. Sie erhielten in der

Versuchsgruppe	I	0,5 ml	Eiklar	1 Std. vor Versuchsbeginn	
"	II	0,5 ml	"	2 Std.	"
"	III	0,5 ml	"	4 Std.	"
"	IV	3 x 0,5 ml	"	24, 12 u. 1 Std.	"
"	V	2 x 0,5 ml	"	24 u. 12 Std.	"

in den Brustmuskel injiziert und nach Ablauf der angegebenen Zeiten 1,0 ml einer wässrigen Lösung von $^{14}\text{-C}$ -carboxylmarkiertem Natriumacetat ($3,0 \times 10^5$ Ipm) zur Erfassung der Syntheserate der Lipide in den Kropf instilliert.

Anschließend kamen die Tiere sofort in den Stoffwechselkäfig (Exsiccator mit 3 Liter Fassungsvermögen), durch den mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe ein gleichmäßiger Luftstrom geführt wurde. Vor dem Exsiccator war zur Entfernung der Luftkohlendensäure eine mit 20 %iger Natronlauge gefüllte Waschflasche geschaltet. Zwischen Exsiccator und Pumpe waren zur Absorption der Exspirations- CO_2 zwei ebenfalls 20 %ige Natronlauge enthaltende Waschflaschen hintereinander angeordnet, deren Inhalt 15, 30, 60, 120 und 150 Minuten nach Beginn des Versuchs erneuert wurde. Das in diesem Zeitraum als Carbonat gesammelte Kohlendioxyd wurde als Bariumcarbonat in der Weise umgefällt, daß jede Fraktion mit 10 ml 21,36 %iger Ammoniumchloridlösung zum Sieden erhitzt und dann heiße 28 %ige Bariumchloridlösung tropfenweise zugegeben wurde. Die Lösung wurde durch einen Glasfiliertiegel, dessen Leergewicht zuvor bestimmt worden war, filtriert und der Tiegel plus Niederschlag in einem Trockenschrank bei 105° bis zur Gewichtskonstanz (12 Std. lang) getrocknet. Nach Ermittlung des Gewichtes wurde eine kleine Menge des Niederschlags in einem Mörser pulverisiert und mit Äthanol aufgeschlemmt. Von dieser Suspension wurde ein Teil als dünne Schicht auf Aluminiumplättchen bekannten Gewichtes gleichmäßig aufgetragen. Die Plättchen wurden getrocknet, gewogen und die Radioaktivität mit dem Methandurchflußzählrohr FH 51 der Fa. Frieseke & Hoepfner (Erlangen-Bruck) bestimmt.

Beim Aufbringen des Carbonats war darauf geachtet worden, daß eine Flächenbelegung von 5 mg/cm^2 Plättchenfläche nicht überschritten wurde, um die Selbstabsorption in Grenzen zu halten. Die gemessenen Impulsraten wurden nach CALVIN u. Mitarb. (1949) auf die Selbstabsorption hin korrigiert.

Nach Beendigung des Atemversuches 150 Minuten nach Versuchsbeginn wurde die Taube dekapitiert, die Leber entnommen und vom Bindegewebe und von den Blutcoagula befreit. Makroskopisch an ihrer Gelbfärbung erkennbare Fettlebern wurden nicht verwendet zur weiteren Aufarbeitung. Die Lebern wurden gewogen und mit der gleichen Menge Wasser mit einem Messerhomogenisator der Fa. E. Bühler (Tübingen) zerkleinert. 10 g dieses Homogenates entsprechend 5 g Lebergewebe wurden in einem Rundkolben mit 500 ml BLOORscher Lösung versetzt. Dabei wurde der Gewebebrei in der Extraktionsflüssigkeit fein verteilt. Die Lösung wurde 1 Stunde lang unter Rückfluß gekocht, nach Erkalten abfiltriert und der Filtrationsrückstand mit 200 ml Chloroform und 40 ml Methanol eine weitere 1/2 Stunde gekocht. Der Geweberückstand wurde anschließend wieder abfiltriert und die vereinigten Filtrate eingedampft. Der verbleibende Rückstand, der die extrahierten Fettstoffe aus 5 g Leber darstellt, wurde mit Petroläther quantitativ in einen 25 ml-Meßkolben übergeführt und die Lösung mit weiterem Petroläther auf 25 ml gebracht. Genau 1,0 ml dieser petrolätherischen Lösung wurde gleichmäßig auf Aluminiumplättchen von 25 mm Durchmesser, die mit siliconisiertem Papier, sog. "Lens"-Papier, bedeckt waren, verteilt. Nach vollständigem Verdampfen des Lösungsmittels wurde die Aktivität der Probe im Methandurchflußzählrohr bestimmt. Von jeder Lösung wurde in dieser Weise 3 Proben gegossen und gezählt.

Die Gesamtlipoide wurden durch Acetonfällung weiter in die Neutralfett- und die Phosphatidfraktion zerlegt. Dazu wurde 12 ml Extrakt in einem Zentrifugenglas bis fast zur Trockene eingedampft, auf 0°C abgekühlt und unter ständigem Rühren mit 30 ml eiskaltem Aceton versetzt. Nach 12 stündigem Stehen im Kühlschrank wurde die überstehende Lösung abgesaugt und in ein Reagenzglas filtriert. Der Niederschlag wurde noch einmal zur Entfernung der restlichen Neutralfette in etwa 15 ml eiskaltem Aceton suspendiert und der Überstand wiederum abfiltriert.

Das Filtrat aus der Acetonfällung, im folgenden als Neutralfette bezeichnet, wurde zur Trockene gebracht, der Rückstand in Petroläther aufgenommen und in einen 10 ml-Meßkolben übergeführt. Die durch die Acetonbehandlung ausgefällten Phosphatide wurden ebenfalls in Petroläther gelöst auf 10 ml aufgefüllt. Von beiden Lösungen wurden 1,0 ml-Portionen auf ihre Radioaktivität hin untersucht wie bei den Gesamtlipoiden beschrieben.

Zur Ermittlung des Substanzgehaltes wurden von allen drei Fraktionen (Gesamtlipoide, Neutralfette und Phosphatide) jeweils 5 ml der petrolätherischen Lösungen in Wägeschälchen eingedampft, bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann das Gewicht bestimmt.

Aus den Zählraten und Gewichten wurde unter Berücksichtigung der eingesetzten Lösungsmittelvolumina auf die Gesamt- $^{14}\text{CO}_2$ -Menge bzw. auf die Lipoide von 5 g Leber umgerechnet.

ERGEBNISSE

I. Atmungsversuchea) Kontrolltiergruppe

In der Tabelle I und der Abbildung 1 sind die Mengen des während der ersten Viertelstunde, in der Zeit zwischen der 15. und 30. Minute, 30. und 60. Minute, 60. und 90. Minute, 90. und 120. Minute sowie 120. und 150. Minute nach der ^{14}C -Acetat-Instillierung in der Ausatemungsluft abgegebenen $^{14}\text{CO}_2$ wiedergegeben. Danach stieg die Verbrennung des zugeführten Acetats zu Kohlendioxyd während der ersten halben Stunde ständig an, um im weiteren Versuchsverlauf dann langsam wieder abzunehmen. Die im gesamten Beobachtungszeitraum ausgeschiedene $^{14}\text{CO}_2$ betrug 133×10^4 Ipm.

Tabelle I. Menge der in den verschiedenen Zeitabschnitten nach $^{14}\text{CO}_2$ -Acetat-Inkorporierung mit der Ausatemungsluft von den unbehandelten Tauben abgegebene $^{14}\text{CO}_2$.

Vers. Nr.	15	30	60	90	120	150 Min.
15	5,61	30,29	21,53	43,80	35,65	18,93
16	5,35	20,37	39,49	27,12	21,32	17,45
19	6,52	11,54	23,24	21,11	22,79	20,77
20	4,13	19,06	38,69	17,38	22,38	4,21
21	8,43	25,76	54,43	29,69	21,24	27,52
22	2,55	13,19	13,01	24,55	20,72	16,68
32	7,02	28,17	62,73	32,30	27,81	26,94
70	2,90	12,95	24,60	32,69	19,12	29,84
Mittelwert	5,32	20,17	34,71	28,70	23,88	20,29
Standardabweichung	$\pm 2,02$	$\pm 7,31$	$\pm 17,28$	$\pm 8,13$	$\pm 5,39$	$\pm 8,18$

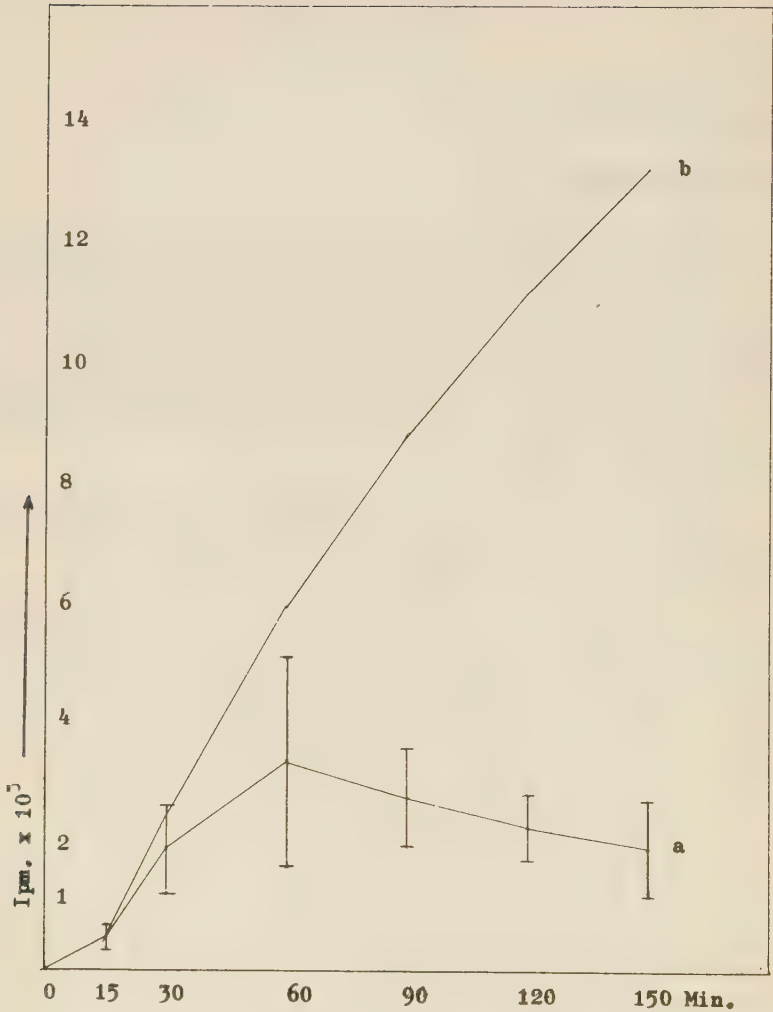


Abbildung 1: Radioaktivität der in den angegebenen Zeitintervallen gesammelte $^{14}\text{CO}_2$ bei den Kontrolltieren (Kurve a). Die Kurve b gibt die Menge der bis zum entsprechenden Zeitpunkt ausgeschiedene Gesamt- $^{14}\text{CO}_2$ -Menge wieder.

Zur Untersuchung der Frage, inwieweit die Maßnahme der Injektion als solche die Untersuchungsergebnisse beeinflusst, wurde einer Taube 0,5 ml dest. Wasser und zwei Tieren jeweils 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung mit gleicher Technik wie den eigentlichen Versuchstieren appliziert. Wie aus den in der Tab. II und der Abb. 2 wiedergegebenen Werten zum Ausdruck kommt, führte der "Spritzeffekt" zu einer Verdopplung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion während der 30. bis 60. Minute gegenüber den Kontrolltieren, nachdem in der ersten halben Stunde die $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung verringert war. Die im Laufe der Versuchsdauer abgeatmete Gesamt- $^{14}\text{CO}_2$ war im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht. Ob die Abweichungen allerdings signifikant sind, kann auf Grund der geringen Zahl der untersuchten Tiere nicht gesagt werden.

Tab. II. Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ nach i. m. Injektion von 0,5 ml dest. Wasser (a) und 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung (b).

Vers. Nr.	15	30	60	90	120	150 Min.
(a) 75	5,00	8,57	99,68	59,03	24,15	26,27
(b) 74	5,96	6,64	51,83	24,73	34,72	14,61
76	1,74	13,18	30,48	38,98	23,81	32,04
Mittelwert	4,23	9,46	60,67	40,91	27,56	24,31
Standardabweichung	<u>+2,25</u>	<u>+3,36</u>	<u>+33,44</u>	<u>+12,87</u>	<u>+6,20</u>	<u>+8,88</u>

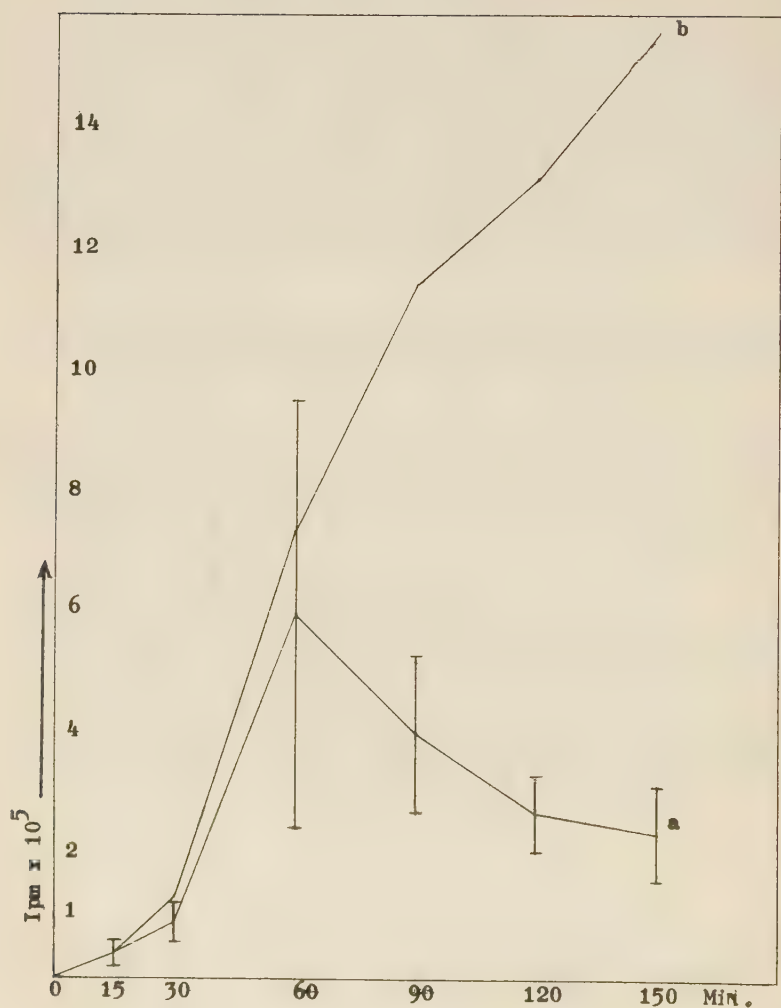


Abbildung 2: Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ nach intramuskulärer Injektion von 0,5 ml dest. Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung.
 Kurve a: Ausscheidung innerhalb des betreffenden Zeitintervalls,
 Kurve b: Gesamtausscheidung bis zum angegebenen Zeitpunkt.

b) Versuchsgruppe IV

Tauben, denen 24, 12 und 1 Stunde vor der ^{14}C -Acetatinkorporierung jeweils 0,5 ml Eiklar injiziert worden war, verbrannten das Acetat vermehrt und verlängert zu CO_2 als unbehandelte. Das geht aus dem Vergleich der Tab. III und Abb. 3 mit den Werten der Normaltiergruppe in der Tab. I bzw. Abb. 1 hervor. Die Gesamt- $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung war um etwa ein Drittel höher als bei den Kontrolltieren.

Tab. III. Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ nach i. m. Injektion von jeweils 0,5 ml Eiklar 24, 12 und 1 Stunde vor Versuchsbeginn.

Vers. Nr.	15	30	60	90	120	150 Min.
27	8,00	48,70	63,24	66,28	38,12	32,36
28	11,58	30,28	71,44	55,14	38,71	24,87
29	8,58	17,22	61,75	53,08	40,31	29,64
30	9,47	23,49	36,35	70,56	33,21	21,66
37	6,21	8,05	42,53	28,93	21,09	11,57
38	11,54	12,53	16,85	36,80	17,63	9,88
Mittelwert	9,56	23,38	48,69	51,80	31,51	21,66
Standardabweichung	$\pm 2,12$	$\pm 13,36$	$\pm 17,70$	$\pm 14,80$	$\pm 9,76$	$\pm 9,26$

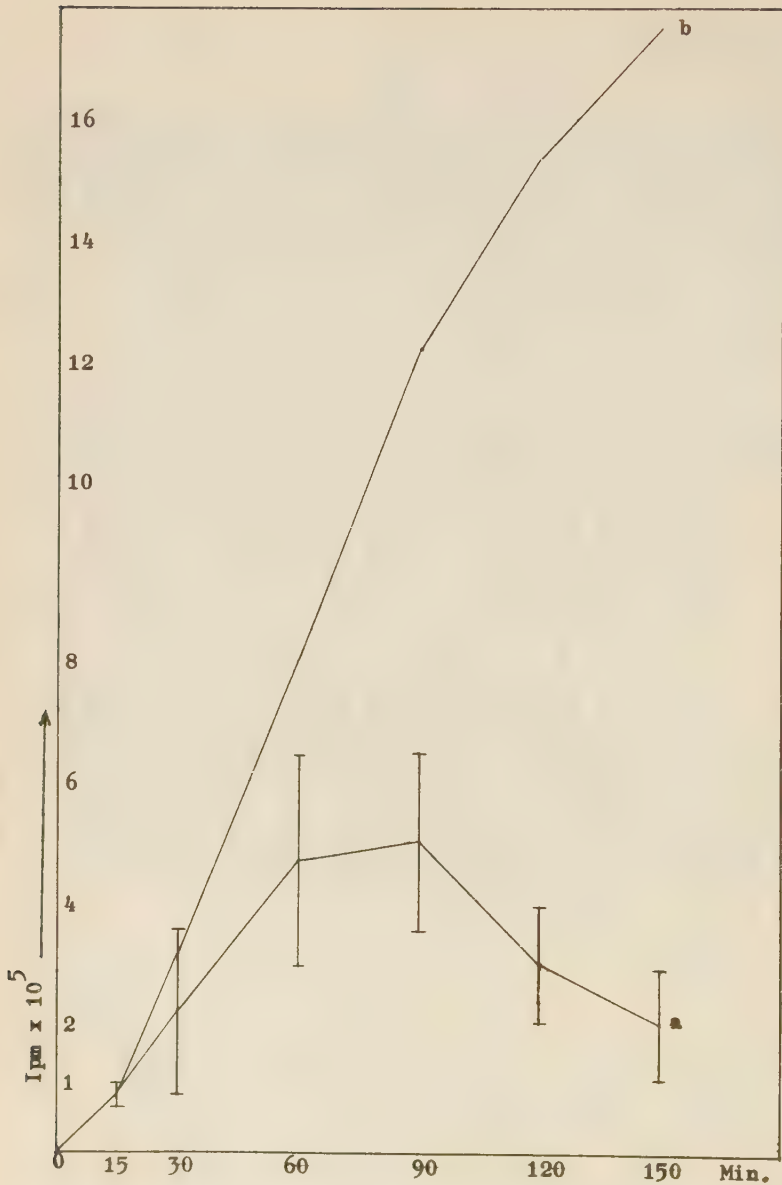


Abbildung 3: Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ nach i. m. Injektion von jeweils 0,5 ml Eiklar 24, 12 und 1 Stunde vor Versuchsbeginn.
 Kurve a: Ausscheidung innerhalb des betreffenden Zeitintervalls,
 Kurve b: Gesamtausscheidung bis zum angegebenen Zeitpunkt.

c) Versuchsgruppe V

Bei den Tauben, denen 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn je 0,5 ml Eiklar intramuskulär zugeführt worden war, ergab sich in der Gesamt- $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung kein Unterschied gegenüber den Kontrolltieren. Das Maximum der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion lag hier jedoch nicht 60 Minuten nach der ^{14}C -Acetatgabe, sondern erst beim 90-Minuten-Wert.

Tab. IV: Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ nach i. m. Injektion von jeweils 0,5 ml Eiklar 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn.

Vers. Nr.	15	30	60	90	120	150 Min.
23	6,27	11,92	22,44	23,14	18,75	42,28
24	1,32	1,48	7,45	31,32	30,47	25,22
25	4,94	12,22	46,50	52,22	44,61	44,09
26	2,83	7,19	23,29	35,11	41,95	42,73
33	7,20	14,68	52,21	45,60	43,38	26,26
34	2,45	6,06	20,29	47,68	43,18	22,66
35	2,04	11,58	30,43	38,00	33,51	17,25
36	2,73	5,96	19,83	29,74	30,06	27,07
Mittelwert	3,70	8,88	27,81	37,73	35,74	30,92
Standardabweichung	$\pm 2,12$	$\pm 4,39$	$\pm 14,81$	$\pm 9,95$	$\pm 9,66$	$\pm 10,44$

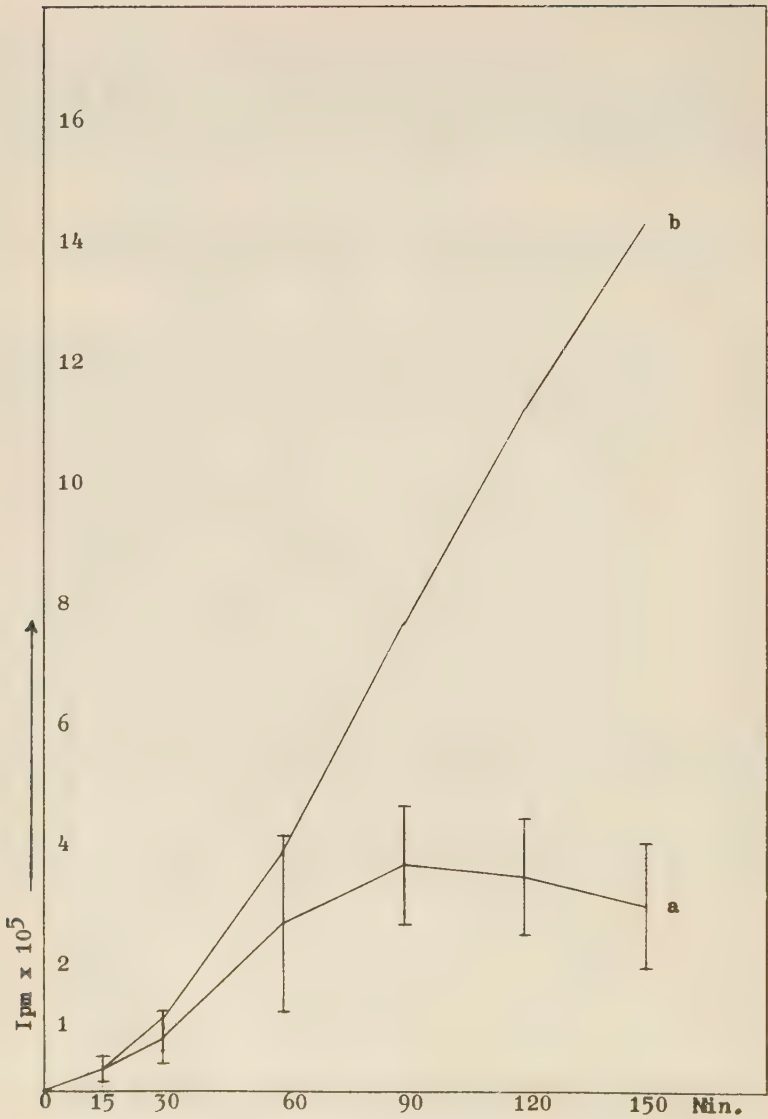


Abb. 4: Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ nach i.m. Injektion von jew 0,5 ml Eiklar 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn.
 Kurve a: Ausscheidung innerhalb des betreffenden Zeitintervalls,
 Kurve b: Gesamtausscheidung bis zum angegebenen Zeitpunkt.

II. Lipogenese

a) Kontrolltiergruppe

Wie im Abschnitt "Durchführung der Versuche" angegeben, wurden alle ermittelten Lipoidgrößen auf die 5 g Leber äquivalenten Mengen umgerechnet. Es ergab sich, wie die Tab. V erkennen läßt, eine erhebliche Schwankungsbreite zwischen den Einzeltieren der Kontrolltiergruppe sowohl der Einbaurate des $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetats in die Gesamtlipoide, wie die in die Phosphatide und in die Neutralfette. Noch stärker aber schwankte der Quotient aus der ^{14}C -Einbaurate in die Neutralfette zu der der Phosphatide (N/P); die Werte lagen hier zwischen den beiden Extremwerten von 0,33 und 1,82.

Tabelle V. ^{14}C -Einbau des $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetats in die Gesamtlipoide, Phosphatidfraktion und Neutralfette der Kontrolltierlebern.

Vers. Nr.	Gesamtfette	Phosphatide	Neutralfette	N/P
15	2,78	2,09	0,70	0,335
16	2,38	2,05	0,94	0,46
19	4,53	1,27	1,08	0,85
20	2,22	1,04	0,49	0,47
21	7,56	2,92	1,37	0,47
22	2,87	0,96	1,72	1,79
32	4,31	1,76	2,53	1,44
70	4,21	1,32	2,67	1,82
Mittelwert	3,76	1,68	1,44	0,92
Standardabweichung	$\pm 1,75$	$\pm 0,65$	$\pm 0,81$	

Die zur Erkennung sog. "Spritzeffekte" mit einer intramuskulären Injektion von 0,5 ml dest. Wasser (Gruppe a) bzw. 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung (Gruppe b) behandelten Tiere zeigten keine derart ausgeprägten Schwankungen der Einbauraten. Besonders das Verhältnis N/P mit den Extremwerten 0,36 und 0,55 erwies sich bemerkenswert konstant, indem der Aktivitätseinbau in die Neutralfette durchweg um die Hälfte des der Phosphatide lag. Die Gesamtlipidsynthese lag auf gleicher Höhe wie in der Kontrolltiergruppe.

Tabelle VI. ^{14}C -Einbau in die Gesamtlipoide und Neutralfette der Lebern von Tauben, die 0,5 ml dest. Wasser (Gruppe a) bzw. 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung (Gruppe b) i. m. injiziert erhalten hatten.

Vers. Nr.	Gesamtfette	Phosphatide	Normalfette	N/P
a) 49	3,08	1,86	1,02	0,55
73	3,29	3,03	1,10	0,36
75	4,65	2,66	1,37	0,52
b) 50	5,09	3,59	1,63	0,45
53	3,57	2,18	1,05	0,48
74	2,49	1,76	0,86	0,49
76	6,72	4,01	1,99	0,50
Mittelwert	4,12	2,72	1,29	0,49
Standardabweichung	$\pm 1,45$	$\pm 0,86$	$\pm 0,40$	

b) Versuchsgruppe I

Als Reaktion auf die i. m. Injektion von 0,5 ml Eiklar 1 Stunde vor Versuchsbeginn kam es zu einer drastischen Senkung des ^{14}C -Acetat-Einbaus in alle Lipide. Setzt man die Gesamtlipidsynthese der Kontrolltiergruppe 100 %, so betrug sie im vorliegenden Fall nur 47 %, also weniger als die Hälfte des Vergleichswertes. An dieser Hemmung waren Phosphatide und Neutralfette gleichermaßen beteiligt.

Tab. VII ^{14}C -Einbau in die Gesamtlipide, Phosphatide und Neutralfette der Lebern von Tauben, denen 1 Stunde vor Versuchsbeginn 0,5 ml Eiklar in den Brustmuskel injiziert worden war.

Vers. Nr.	Gesamtfette	Phosphatide	Neutralfette	N/P
43	0,92	0,56	0,28	0,50
45	1,59	0,93	0,78	0,84
51	1,80	0,96	0,45	0,47
58	2,21	1,76	1,23	0,70
77	2,35	1,59	1,01	0,64
Mittelwert	1,77	1,16	0,79	0,67
Standardabweichung	$\pm 0,56$	$\pm 0,49$	$\pm 0,38$	

c) Versuchsgruppe II

Wurden den Tauben das Eiklar 2 Stunden vor Versuchsbeginn in der geschilderten Weise zugeführt, so erniedrigte sich die Gesamtlipoidsynthese im Mittel auf 51 %. Da diese Gruppe jedoch nur aus zwei Tieren bestand, erlauben die vorliegenden Werte keine definitiven Aussagen.

Tab. VIII. ^{14}C -Einbau in die Gesamtlipoide, Phosphatide und Neutralfette der Lebern von Tauben, denen 2 Stunden vor Versuchsbeginn 0,5 ml Eiklar in den Brustmuskel injiziert worden war.

Vers. Nr.	Gesamtfette	Phosphatide	Neutralfette	N/P
54	0,47	0,15	0,16	1,07
55	3,39	1,18	0,78	0,66
Mittelwert	1,93	0,66	0,47	0,70
Standardabweichung	$\pm 2,05$	$\pm 0,73$	$\pm 0,42$	

d) Versuchsgruppe III

In dieser Gruppe war den Tieren das Eiklar bereits 4 Stunden vor Versuchsbeginn gespritzt worden. Die Hemmung der Lipoidsynthese war entsprechend geringer; der Aktivitätseinbau in die Gesamtlipoide betrug 67 % der Kontrollgruppe. Es scheint, als ob die noch vorhandene Synthesehemmung ausschließlich die Neutralfette betraf, da der Aktivitätseinbau bei den Phosphatiden fast die Werte der Kontrollgruppe erreicht hatte.

Tab. IX. ^{14}C -Einbau in die Gesamtlipoide, Phosphatide und Neutralfette der Lebern von Tauben, denen 4 Stunden vor Versuchsbeginn 0,5 ml Eiklar in den Brustmuskel injiziert worden war.

Vers. Nr.	Gesamtfette	Phosphate	Neutralfette	N/P
52	1,31	1,04	0,50	0,48
56	3,70	2,30	1,06	0,46
79	2,55	1,48	1,26	0,85
Mittelwert	2,52	1,60	0,89	0,55
Standardabweichung	$\pm 1,19$	$\pm 0,65$	$\pm 0,46$	

e) Versuchsgruppe IV

Eine ausgeprägte Hemmung der Lipidsynthese wurde wieder in der Tiergruppe ermittelt, die 24 Stunden, 12 Stunden und 1 Stunde vor der Acetatzufuhr mit dem Eiklar behandelt worden war. Die ^{14}C -Einbaurate betrug nur 43 % der Kontrollgruppe; sie lag damit ähnlich niedrig wie bei der Tiergruppe, die eine einzelne Injektion 1 Stunde vor Versuchsbeginn erhalten hatte. Auch hier betraf die Synthesehemmung gleichmäßig alle beiden Lipoidfraktionen.

Tab. X. ^{14}C -Einbau in die Gesamtlipoide, Phosphatide und Neutralfette der Lebern von Tauben, denen 24 Stunden, 12 Stunden und 1 Stunde vor Versuchsbeginn jeweils 0,5 ml Eiklar in den Brustmuskel injiziert worden war.

Vers. Nr.	Gesamtfette	Phosphatide	Neutralfette	N/P
27	0,94	0,52	0,41	0,79
28	3,27	2,19	0,90	0,41
29	1,24	0,62	0,54	0,87
30	0,83	0,38	0,49	1,29
37	1,19	0,72	0,45	0,62
38	2,17	1,22	0,73	0,60
Mittelwert	1,61	0,94	0,59	0,62
Standardabweichung	$\pm 0,93$	$\pm 0,65$	$\pm 0,22$	

f) Versuchstiergruppe V

Bei diesen Tieren lag die Eiklar-Injektion 12 Stunden zurück. Trotzdem sie außerdem bereits 12 Stunden zuvor eine weitere derartige Injektion erhalten hatten, lag die Syntheserate der Gesamtlipoide und die der Phosphatide wie Neutralfette auf ähnlicher Höhe wie bei den Kontrolltieren.

Tab. XI. ^{14}C -Einbau in die Gesamtlipoide, Phosphatide und Neutralfette der Lebern von Tauben, denen 24 Stunden und 12 Stunden vor Versuchsbeginn jeweils 0,5 ml Eiklar in den Brustmuskel injiziert worden war.

Vers. Nr.	Gesamtfette	Phosphatide	Neutralfette	N/P
23	3,19	1,52	0,72	0,47
25	4,14	1,97	1,45	0,73
26	2,71	1,32	1,03	0,80
33	2,82	1,64	1,34	0,81
34	3,26	1,63	1,68	1,03
36	2,28	1,39	0,84	0,60
44	4,53	2,21	1,98	0,90
46	3,45	2,20	1,32	0,60
Mittelwert	3,30	1,74	1,30	0,75
Standardabweichung	$\pm 0,74$	$\pm 0,34$	$\pm 0,42$	

DISKUSSION

Der Mechanismus der Fettsäuresynthese ist heute in großen Zügen bekannt. In der Taubenleber (HSU u. Mitarb. 1965) werden jeweils ein Mol Acetyl-CoA und ein Mol Malonyl-CoA jedes für sich an eine Sulfhydrylgruppe des Synthetase-Enzyms kovalent gebunden. Dieses Synthetase-Enzym ist ein Multienzymkomplex mit Eiweißcharakter, der sich elektrophoretisch und bei der Sedimentationsanalyse in der Ultrazentrifuge als einheitlich erwiesen hat. Sein Molekulargewicht beträgt $5,4 \times 10^5$ g. Zwischen dem Acetyl- und dem Malonylrest kommt es unter Decarboxylierung der Malonylgruppe zur Ausbildung einer C-C-Bindung zwischen der Carboxylgruppe des Acetats und der Methylen-Gruppe des Malonats. Im weiteren Verlauf der Synthetase-Reaktion löst sich die Thioesterbindung des Acetats mit dem Enzym, es kommt zur sukzessiven Reduzierung in der Kohlenstoffkette bis zur Bildung der Butyrylverbindung und schließlich wird der Butyrylrest von der Sulfhydrylgruppe übernommen, an das ursprünglich die Acetylgruppe gebunden war. Die dadurch freiwerdende Thiogruppe lagert einen neuen Malonylrest an und der Vorgang wiederholt sich solange, bis die derart entstandene Kohlenstoffkette eine Länge von 16 C-Atomen besitzt. Diese Synthetase-Reaktion ist durch Palmityl-CoA und geringer auch durch das freie CoA zu hemmen.

Das Zentralprodukt des Intermediärstoffwechsels ist das Acetyl-CoA. Damit es für den Synthese-Zyklus der Fettsäuren verwendbar wird, muß es zuvor in einer vorgeschalteten Reaktion zum Malonyl-CoA carboxyliert werden. Dieses geschieht mit Hilfe der Acetyl-CoA-Carboxylase, einem biotinhaltigen Enzym, das allgemein als limitierender Faktor der Gesamtfettsäuresynthese angesehen wird (MASORO 1962) und das mit dem im Vogeleiereiweiß enthaltenem Glykoprotein Avidin reversibel zu inaktivieren ist. Das biologische Vorkommen des Avidins legt den Gedanken nahe, daß diese Substanz dem sich entwickelnden Vogelembryo zum gleichen Zweck dient. Es wurde nun die Möglichkeit erwogen, ob -wenigstens im Vogelorganismus- auch beim erwachsenen Tier Avidin eine regulierende Funktion bei der Fettsäuresynthese besitzt. Zur Klärung dieser Frage wurden die vorliegenden Untersuchungen unternommen.

Als Versuchstiere wurden junge Tauben verwendet, die bekanntlich einen hohen Stoffwechselumsatz und damit auch eine hohe Syntheserate für Fettsäuren (WAKIL 1961) aufweisen. Wegen der Inaktivierung des Avidins bei alimentärer Zufuhr durch Bildung eines stabilen Komple-

xes mit dem von den Darmbakterien produzierten Biotin mußte die parenterale Verabreichung gewählt werden. An Stelle des Avidins selbst wurde das Eiklar von frischen Hühnereiern verwendet. Um den durch den Vorgang der intramuskulären Injektion als solchen ausgelösten Effekt auf die Lipidsynthese in der Leber zu erfassen, wurden im Rahmen der Kontrollversuche auch Tiere mit den gleichen Mengen destilliertem Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung und in gleicher Weise behandelt, wie die eigentlichen Versuchstiere mit Eiklar. Es ließ sich kein Unterschied zu den sofort verwendeten Kontrolltieren sowohl hinsichtlich der Lipidsynthese als auch hinsichtlich der Verbrennung von Acetat zu CO_2 feststellen. Damit läßt sich die Verfälschung der Versuchsergebnisse durch einen sog. "Spritzeffekt" ausschließen.

Die stärkste Beeinflussung der Lipidsynthese in der Leber wurde erreicht, wenn den Tauben das Eiklar unmittelbar (d. h. eine Stunde) vor der ^{14}C -Acetatverabreichung appliziert wurde. Es kam dann zu einer drastischen Hemmung auf mehr als die Hälfte der normalen ^{14}C -Einbaurrate durch verminderten Einbau sowohl in die Neutralfette als auch in die Phosphatidfraktion. Je länger nun der Zeitraum zwischen der Injektion des Eiklars und der ^{14}C -Acetat-Gabe gewählt wurde, desto geringer war die erzielte Wirkung auf die Lipidsynthese. Lag die Injektion sogar schon 12 Stunden zurück, so konnte selbst bei Vornahme einer zweiten Eiklarapplikation 24 Stunden vor Versuchsbeginn kein Unterschied mehr gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden. Andererseits stellte sich die Hemmung sofort wieder in ausgeprägtem Maße ein, wiederholte man ein drittes Mal, und zwar jetzt wieder unmittelbar vor Versuchsbeginn, die Injektion. Die Abbildung 4 gibt eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse.

Geht man von der Voraussetzung aus, die Avidinzufuhr in Form des Eiklars hat bei den Tieren tatsächlich zu einer teilweisen Inaktivierung der Leber-Acetyl-CoA-Carboxylase geführt, so erheben sich eine ganze Reihe von Zusatzforderungen. Als erstes muß das Avidin aus dem Gewebe der Brustmuskulatur in die Blutbahn übergegangen sein. Das kann -wenigstens für eine gewisse Menge des Avidins- als möglich angesehen werden. Als nächste muß das Avidin aus der Blutbahn durch die Endothelwand der Leberkapillaren, den perivaskulären Raum und die eigentliche Zellmembran hindurch ins Innere der Leberzellen eingetreten sein. Wie weit ein derart großes Molekül dazu in der Lage ist, läßt sich ohne entsprechende Versuche nicht sagen. Drittens hat die in der Leberzelle sich einstellende Avidinkonzentration bei der verabfolgten Dosis zu einer Inaktivierung wenigstens der Hälfte der vorhandenen Acetyl-CoA-Carboxylase-Moleküle geführt. Nach den in vitro-Versuchen u. a. von VILLINGER (1962) kann an dieser Möglichkeit nicht gezweifelt werden. Und viertens muß es im Anschluß daran wieder entweder

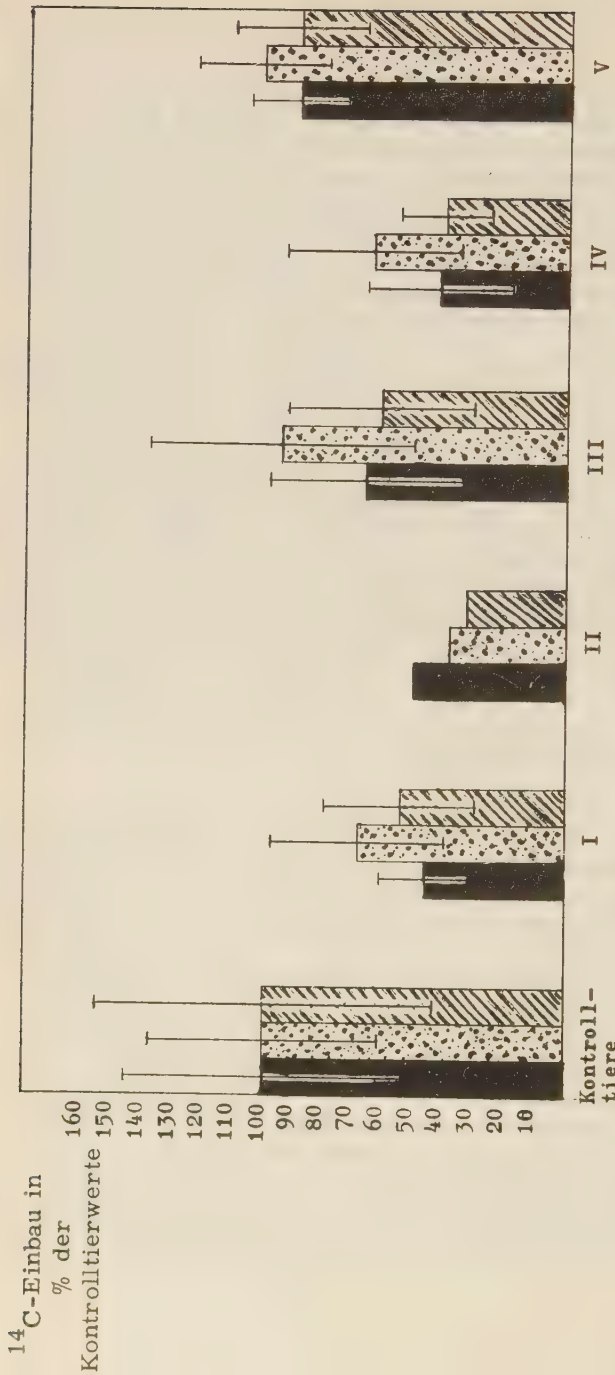


Abb. 5: Die Einbauraten von ^{14}C -Acetat in die Gesamtlipide (schwarze Säulen), Phosphatide (punktierte Säulen) und Neutralfette (schraffierte Säulen) der Lebern von Tauben, die 1 Stunde (Versuchgruppe I), 2 Stunden (Versuchgruppe II), 4 Stunden (Versuchgruppe III), 24 Stunden, 12 Stunden und 1 Stunde (Versuchgruppe IV) sowie 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn (Versuchgruppe V) jeweils 0,5 ml Eiklar in den Brustmuskel infiziert erhalten hatten im Vergleich mit den Kontrolltieren.

zu einer raschen Reaktivierung der Carboxylaseaktivität durch Austausch des avidingebundenen Carboxylasebiotins gegen neu aus dem Darm resorbiertes Biotin oder -wahrscheinlicher- zu einer Neubildung des Carboxylaseproteins + Einschleusung neuer Biotinmoleküle in die Leberzelle + Vereinigung beider Verbindungen zum funktionstüchtigen Holoferment gekommen sein. Aber gerade das muß für sehr unwahrscheinlich gehalten werden, denn die Resorption des verabfolgten Avidins -vor allem als "Depot" durch Bindung im Eiklar- wird sich sicher über einen längeren Zeitraum hinziehen, sodaß in der Blutbahn ein ausreichender Avidinspiegel vorhanden gewesen sein muß, um die Serumkonzentration an freiem Biotin entsprechend lange niedrig zu halten und damit eine Biotinzufuhr in die Leberzelle von außen unmöglich zu machen. Erst recht sollte das wiederholte Setzen eines "Avidin-Depots", wie bei der Versuchsgruppe V, in dieser Weise wirksam sein. Weiterhin bedarf es zur Neubildung des Carboxylase-Apofermentes und deren Einbau in die Fettsäuresynthetisierenden Strukturen sicher einen längeren Zeitraum, als es die Versuchsergebnisse zulassen.

Nach diesen Überlegungen erscheint die Deutung der erzielten Effekte im Sinne einer unspezifischen Reaktion des Organismus auf die Eiklar-Injektion hin eher gerechtfertigt. Das verabfolgte Material bestand in erster Linie aus Fremdeiweiß. Das Einbringen derartiger Mengen in einer Weise, die die Resorption derselben und ihre Einführung in den Blutkreislauf ermöglicht, dürfte durchaus eine Umsteuerung der anabolen Stoffwechsellage in der Leberzelle in die katabole Richtung bedingen, da der Körper versuchen wird, diese Stoffe unter Energieaufwand durch Abbau zu entgiften und damit zu eliminieren. Die Steigerung der CO_2 -Ausscheidung in der Ausatemungsluft und die Reduktion der Lipidsynthese als Antwort auf die Eiklar-Injektion erklärt sich am zwanglosesten in dieser Weise.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung der Avidin-Wirkung auf die in vivo-Lipidsynthese wurden jungen Tauben mit hoher Stoffwechselaktivität jeweils 0,5 ml Eiklar 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden, 24, 12 und 1 Stunde sowie 24 und 12 Stunden vor peroraler Gabe von ^{14}C -markiertem Acetat injiziert. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung der Tiere in der Expirationsluft wurde während der folgenden 2 1/2 Stunden verfolgt, die Tiere anschließend getötet und die eingebaute ^{14}C -Aktivität in die Gesamtlipoide, Phosphatide und Neutralfette der Lebern ermittelt.

Es ergab sich eine Hemmung der Lipidsynthese, deren Ausmaß im Zusammenhang mit dem zeitlichen Abstand der Eiklar-Injektion von der Acetatgabe stand. Die stärkste Reduktion wurde erzielt, wenn die Substanz den Tauben 1 Stunde vor Versuchsbeginn verabfolgt wurde. Je länger der Zeitraum zwischen Injektionen und Acetatgabe war, desto mehr verringerte sich der erzielte Effekt. Nach Eiklar-Vorbehandlung 12 Stunden vor der Ermittlung der Syntheserate für die Lipoide ergab sich kein Unterschied mehr zu den Kontrolltieren.

Nur bei den Tauben, die eine Stunde vor Versuchsbeginn mit der Eiklar-Injektion behandelt worden waren, konnte eine Erhöhung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung um ein Drittel gegenüber den Kontrolltieren ermittelt werden.

Nach Darstellung des heutigen Forschungsstandes über den Mechanismus der Fettsäuresynthese wurden die Versuchsergebnisse als Effekte unspezifischer Natur diskutiert, da bei den vorliegenden Versuchen eine Reihe von Gründen gegen die Annahme einer direkten Avidinhemmung der Lipidsynthese sprechen.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALLEN, S.H.G., R. STJERNHOLM u. H.G. WOOD:
J. Biol. Chem. 238, 2889 pc (1963).
- ANSELL, G.B., u. J.N. HAWTHORNE:
Phospholipids. Chemistry, Metabolism and Function.
Elsevier Publ. Co., Amsterdam - London - New York
1964.
- BOAZ, M.A.: Biochem. J. 18, 422 (1924).
- BRADY, R.O.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 44, 993 (1958).
- BRADY, R.O., A.-M. MAMOON u. E.R. STADTMAN:
J. Biol. Chem. 222, 795 (1956).
- BREMER, J.: J. Biol. Chem. 237, 2228 (1962).
- BRESSLER, R., u. S.J. FRIEDBERG:
J. Biol. Chem. 239, 1364 (1964).
- BRESSLER, R., u. R.I. KATZ:
J. Clin. Invest. 43, 1263 (1964).
- BRESSLER, R., u. S.J. WAKIL:
J. Biol. Chem. 237, 1441 (1962).
- BRODIE, J.D., G. WASSON u. J.W. PORTER:
J. Biol. Chem. 239, 1346 (1964).
- CALVIN, M., C. HEIDELBERGER, J.C. REID, B.M. TOLBERT u.
P.E. YANKWICH: Isotopic Carbon. John Wiley & Sons Inc., New York -
Chapman & Hall Ltd., London 1949.
- CONIGLIO, J., u. G. POPJAK:
Biochem. J. 84, 17 P (1962).
- DU VIGNEAUD, V., K. DITTMER, K. HOFMANN u. D.B. MELVILLE:
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 50, 374 (1942).
- EAKIN, R.E., E.E. SNELL u. R.J. WILLIAMS:
J. Biol. Chem. 136, 801 (1940).
- EAKIN, R.E., E.E. SNELL u. R.J. WILLIAMS:
J. Biol. Chem. 140, 535 (1941).
- FRAENKEL-CONRAT, K., N.S. SNELL u. E.D. DUCAY:
Arch. Biochem. Biophys. 39, 80 (1952).

- FRAPS, R., R. HERTZ u. W.H. SEBRELL:
Prox. Soc. Exptl. Biol. Med. 52, 140 (1943).
- FRITZ, I.B., u. K.T.N. YUE:
J. Lipid Res. 4, 279 (1963).
- GANGULY, J.: Biochim. Biophys. Acta 40, 110 (1960).
- GIBSON, D.M.: Fatty Acid Biosynthesis. In: R.T. HOLMAN,
W.O. LUNDBERG u. T. MALKIN: Progress in the
Chemistry of Fats and Other Lipids. Vol. VI, S. 118.
Pergamon Press, Oxford - London - New York -
Paris 1963.
- GIBSON, D.M., M.I. JACOB, J.W. PORTER, A. TIETZ u. S.J. WAKIL:
Biochim. Biophys. Acta 23, 219 (1957).
- GIBSON, D.M., E.B. TITCHENER u. S.J. WAKIL:
J. Amer. Chem. Soc. 80, 2908 (1958a).
- GIBSON, D.M., E.B. TITCHENER u. S.J. WAKIL:
Biochim. Biophys. Acta 30, 376 (1958b).
- GOLDMAN, P.: J. Biol. Chem. 239, 3663 (1964).
- GOLDMAN, P., A.W. ALBERTS u. P. ROY VAGELOS:
J. Biol. Chem. 238, 3579 (1963).
- GREEN, N.M.: Biochim. Biophys. Acta 59, 244 (1962).
- GREEN, N.M.: Biochem. J. 89, 599 (1963a).
- GREEN, N.M.: Biochem. J. 89, 609 (1963b).
- GREEN, N.M.: Biochem. J. 89, 585 (1963c).
- GREEN, N.M.: Biochem. J. 94, 23c (1965).
- GYORGY, P. in W.H. SEBRELL u. R.S. HARRIS:
The Vitamins. Vol. 1, S. 526. Academic Press Inc.,
New York (1954).
- HALENZ, D.R., u. M.D. LANE:
J. Biol. Chem. 235, 878 (1960).
- HARLAN jr., W.R. u. S.J. WAKIL:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 131 (1962).
- HERTZ, R.: Physiol. Rev. 26, 479 (1946).
- HERTZ, R., u. W.H. SEBRELL:
Science 96, 257 (1942).
- HERTZ, R., R.M. FRAPS u. W.H. SEBRELL:
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 52, 142 (1943).

- HERTZ, R., R.M. FRAPS u. W.H. SEBRELL:
Science 100, 35 (1944).
- HSU, R.Y., G. WASSON u. J.W. PORTER:
J. Biol. Chem. 240, 3736 (1965).
- HÜLSMANN, W.C.:
Biochim. Biophys. Acta 45, 623 (1960).
- HÜLSMANN, W.C.:
Biochim. Biophys. Acta 58, 417 (1962).
- JONES, P.D., u. M.H. BRIGGS:
Life Sciences 1, 621 (1962).
- KAPLAN, N.O., u. F. LIPMANN:
J. Biol. Chem. 162, 745 (1946).
- KAZIRO, Y., E. LEONE u. S. OCHOA:
Proc. Natl. Acad. Sci. 46, 1319 (1960).
- KAZIRO, Y., L.F. HASS, P.D. BOYER u. S. OCHOA:
J. Biol. Chem. 237, 1460 (1962).
- KNAPPE, J., H.G. SCHLEGEL u. F. LYNEN:
Biochem. Z. 335, 101 (1961a).
- KNAPPE, J., E. RINGELMANN u. F. LYNEN:
Biochem. Z. 335, 168 (1961b).
- LANE, M.D., D.R. HALENZ, D.P. KOSOW u. C.S. HEGRE:
J. Biol. Chem. 235, 3082 (1960).
- LEVY, H.R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 267 (1963).
- LICHSTEIN, H.C., u. J. BIRNBAUM:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 41 (1965).
- LIPMANN, F.: Bact. Rev. 17 1 (1953).
- LYNEN, F.: Liebigs Ann. 552, 276 (1952).
- LYNEN, F.: Federation Proc. 12, 683 (1953).
- LYNEN, F.: J. Cell Comp. Physiol. 54, Suppl. 1, 33 (1959).
- LYNEN, F.: Federation Proc. 20, 941 (1961).
- LYNEN, F., u. K.L. ROMINGER:
22, 537 (1963).
- LYNEN, F., I. KESSEL u. H. EGGERER:
Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse der
Bayerischen Akademie der Wissenschaften,
Sitzung vom 4. März 1960.

- LYNEN, F., J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING u. E. RINGEL-MANN:
Angew. Chem. 71, 481 (1959a).
- LYNEN, F., J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING u. E. RINGEL-MANN:
Die biochemische Funktion des Biotins. Sitzungsbericht der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse der Bayerischen Akademie der Wissenschaften (1959b).
- LYNEN, F., J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING, E. RINGEL-MANN u. J. P. LACHANCE:
Biochem. Z. 335, 123 (1961).
- MAJERUS, P. J., A. W. ALBERTS u. P. ROY VAGELOS:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 1231 (1964).
- MARTIN, D. B., u. P. ROY VAGELOS:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 4 (1962a).
- MARTIN, D. B., u. P. ROY VAGELOS:
J. Biol. Chem. 237, 1787 (1962b).
- MASORO, E. J.: J. Lipid Res. 3, 149 (1962).
- MELAMED, M. D. u. N. M. GREEN:
Biochem. J. 89, 591 (1963).
- MELVILLE, D. B., J. G. PIERCE u. C. W. H. PARTRIDGE:
J. Biol. Chem. 180, 299 (1949).
- MICKELSEN, O.:
Vitam. and Horm. 14, 1 (1956).
- NORUM, K.: Acta Chem. Scand. 17, 896 (1963).
- NORUM, K., u. J. BREMER:
Biochim. biophys. Acta 78, 77 (1963).
- NUMA, S., M. MATSUHASHI u. F. LYNEN:
Biochem. Z. 334, 203 (1961).
- PENNINGTON, D., E. E. SNELL u. R. E. EAKIN:
J. Amer. Chem. Soc. 64, 469 (1942).
- RITTENBERG, D., u. K. BLOCH:
J. Biol. Chem. 160, 417 (1945).
- ROBINSON, J. D., R. M. BRADLEY u. R. O. BRADY:
J. Biol. Chem. 238, 528 (1963).
- SCHAEFFER, H. J., u. P. S. BHARGAVA:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 468 (1964).

- SCHWEIZER, E., D. OESTERHELT, W. CHAN, Ch. DUBA u. F. LYNEN: Zum Mechanismus der Fettsäuresynthese. 16. Mosbacher Kolloquium: Lipoide 28. - 30. April 1965.
- SEBRELL, W.H., u. R.S. HARRIS: The Vitamins, Vol. 1. Academic Press Inc., New York 1954.
- SEITZ, W., u. V. von BRAND: Z. ges. Inn. Med. Grenzgeb. 13, 764 (1958).
- SEUBERT, W., F. GREULL u. F. LYNEN: Angew. Chem. 69, 359 (1957).
- SMITH, S., u. R. DILS: Biochim. Biophys. Acta 84, 776 (1964).
- SPENCER, A.F., u. J.M. LÖWENSTEIN: J. Biol. Chem. 237, 3640 (1962).
- SRERE, P.A., u. A. BHADURI: Biochim. Biophys. Acta 59, 487 (1962).
- STERN, J.R., D.L. FRIEDMAN u. G.K.K. MENON: Biochim. Biophys. Acta 36, 299 (1959).
- SWICK, R.W., u. H.G. WOOD: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46, 28 (1960).
- UTTER, M.F., u. D.B. KEECH: J. Biol. Chem. 235, pc 17 (1960).
- VAGELOS, P. ROY, A.W. ALBERTS u. D.B. MARTIN: J. Biol. Chem. 238, 533 (1963).
- VILLINGER, C.: Diss. München 1962.
- VON BRAND, V.: Biochem. Z. 331, 162 (1959).
- VON BRAND, V., u. E. HELMREICH: Biochem. Z. 328, 146 (1956).
- WAITE, M., u. S.J. WAKIL: J. Biol. Chem. 238, 77 (1963a).
- WAITE, M., u. S.J. WAKIL: J. Biol. Chem. 238, 81 (1963b).
- WAKIL, S.J.: J. Amer. Chem. Soc. 80, 6465 (1958).
- WAKIL, S.J.: Federation Proc. 19, 227 (1960).
- WAKIL, S.J.: J. Lipid Res. 2, 1 (1961).

- WAKIL, S.J.: The Biosynthesis of Fatty Acids in Animal Tissues.
In: F.A. KUMMEROW: Metabolism of Lipids as
Related to Atherosclerosis. S. 155. C.C. Thomas
Publ. Springfield, Ill. USA 1965.
- WAKIL, S.J., u. R. BRESSLER:
J. Biol. Chem. 237, 687 (1962).
- WAKIL, S.J., u. D.M. GIBSON:
Biochim. Biophys. Acta 41, 122 (1960).
- WAKIL, S.J., E.B. TITCHENER u. D.M. GIBSON:
Biochim. Biophys. Acta 29, 225 (1958).
- WAKIL, S.J., D.M. GIBSON u. A. HARPER (1959) - zit. bei GIBSON
(1963).
- WAKIL, S.J., L.W. McLAIN jr. u. J.B. WARSHAW:
J. Biol. Chem. 235, PC 31 (1960).
- WHITE, D., u. H.P. KLEIN:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 78 (1965).
- VALLOTTON, M., u. F. LEUTHARDT:
Helv. Chim. Acta 47, 311 (1964).

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor der Medizinischen Poliklinik der Universität München unter der Leitung von Dr. phil. et Dr. med. Vera von Brand ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Seitz, Direktor der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in München, für die Überlassung des Themas.

Gleichfalls möchte ich von ganzem Herzen meiner "Doktor-Mutter", Frau Dr. phil. et Dr. med. Vera von Brand danken für ihre hilfreiche Betreuung.

Meinen herzlichen Dank auch Herrn Dr. med. D. Eberhagen für seine sorgfältige und freundliche Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

L E B E N S L A U F

Ich wurde als Sohn des Pfarrers Behnam Siauisch
uns seiner Ehefrau Maria (Meriam), geborene Iiasko,
am 15. Juni 1937 in Ankawa-Arbil/Irak geboren.

Von 1943 - 1949 besuchte ich die Volksschule in
Ankawa. Nach 6 Jahren Oberschule in Arbil legte ich
das Abitur ab. Anschließend leistete ich 19 Monate Mi-
litärdienst in Baghdad und Karkuk.

Am 8. Mai 1958 kam ich nach Deutschland und er-
lernte zunächst am Goethe-Institut in Bad Reichenhall
die deutsche Sprache. Im Wintersemester 1958/59 begann
ich das Medizin-Studium an der Medizinischen Fakultät
der Universität München. Nach dem Probestudium, dem
Vorphysikum und dem Physikum habe ich mein Staats-
examen am 17. Februar 1965 in München abgelegt.
Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent an der Medizini-
schen Poliklinik der Universität München tätig.

